产 γ-氨基丁酸粪肠球菌的筛选及 γ-氨基丁酸的定量

朱　泉[1]　程金龙[2]　朱元召[3*]　尹　龙[2]　倪晋东[2]　程茂基[1]

（1.安徽农业大学动物科技学院，合肥 230061；2.江苏优仕生物科技发展有限公司，宿迁 223831；3.安徽科技学院动物科学学院，凤阳 233100）

摘　要：本试验旨在利用分子生物学方法鉴定分离得到 1 株产 γ-氨基丁酸（GABA）粪肠球菌，并定量测定所产 GABA 的量。从泡菜、酸奶、土壤、新鲜牛奶样品中筛选出一目标菌株 F6，进行形态学特征与革兰氏染色鉴定；再扩增 F6 菌株的 16S rDNA 基因，然后测定该基因序列和构建系统发育树；同时采用高效液相色谱（HPLC）法定量测定菌株 F6 发酵液中的 GABA 含量。结果表明：菌株 F6 菌落大而光滑、圆形、直径 1~2 mm、边缘整齐、乳白色；在分离培养基上菌落周围形成透明圈，使分离培养基呈黄色；在 MRS 固体培养基上菌落不透明，周围有透明圈。革兰氏染色鉴定 F6 为阳性菌。分子生物学鉴定分析显示，菌株 F6 的 16S rDNA 基因序列与 GenBank 数据库中粪肠球菌（*Enterococcus faecium*）的相似性大于 99%。HPLC 法测定得到 GABA 标准曲线线性方程为 Y=7 080 733.139 5X-4 511.692 7（R^2=0.999 4），通过方程得出 F6 菌株发酵液中的 GABA 含量为 7.1 g/L，保留时间为 7~10 min。结果提示，本试验筛选得到 1 株高产 GABA 的粪肠球菌 F6。

关键词：粪肠球菌；γ-氨基丁酸；16S rDNA 基因序列；高效液相色谱法定量；筛选

中图分类号：S816.7　　　　文献标识码：A　　　　文章编号：

乳酸菌具有调节机体胃肠道微生态平衡、有益于畜禽健康、改善畜禽生产性能、减少环境污染、替代饲用抗生素等重要作用，在动物生产中的应用日益广泛。然而，乳酸杆菌为厌氧菌，抗逆性差、不耐氧、易失活，应用效果不稳定，而球菌较杆菌具有更强的抗逆性，菌株活性损失较低，未来球菌尤其是肠球菌的应用将更普遍。

γ-氨基丁酸（GABA）又称氨酪酸[1]，分子式为 $C_4H_9NO_2$，是哺乳动物中枢神经系统一种主要的抑制性神经递质，介导 40%以上的抑制性神经传导[2-3]。GABA 对人具有调节血压、改善脑部机能、增强记忆力、抗

收稿日期：2016-02-24

基金项目：安徽高校自然科学研究项目计划（KJ2015A247）；宿迁市农业科技支撑项目（L201405）；宿迁市产业发展引导资金项目（M201512）

作者简介：朱　泉（1994-），男，安徽全椒人，硕士研究生，从事动物营养与饲料科学研究。E-mail: zhudtq@163.com

*通信作者：朱元召，教授，硕士生导师，E-mail: zhuyuanzhao111@163.com

焦虑、镇痛等生理活性，对畜禽具有促进采食、抗应激、镇静、改善生产性能等功效[4]，尤其是抗热应激作用显著。GABA 合成制备的方法主要有化学合成、微生物发酵等，目前畜禽生产上应用的 GABA 多为化学合成品，是提纯品，成本昂贵，颇少见应用微生物发酵产生的 GABA[5]。

长期以来，学者致力于研究乳酸菌等单一功能的微生态制剂与化学合成提纯的 GABA，已清楚乳酸菌和 GABA 均是重要的功能性添加剂[6]。但有关能分泌 GABA 的乳酸菌的研究较少。粪肠球菌属肠球菌属，又称粪链球菌，可分成许多群，粪链球菌属于 D 群，D 群链球菌中的肠球菌包括粪链球菌、尿链球菌和坚忍链球菌。粪肠球菌分布广泛，主要栖居在动物肠道、粪便及土壤等厌氧基质中。自然界存在的肠球菌所能分泌的 GABA 量很少或不能分泌，需要摸索满足适宜生长条件以提高其 GABA 产量，目前对产 GABA 粪肠球菌的研究颇少。为此，本试验开展高产 GABA 粪肠球菌的筛选与鉴定，既能应用绿色微生态和微生物发酵所产天然 GABA，降低 GABA 添加成本，又能叠加发挥 GABA 抗应激与乳酸菌微生态平衡调控的双重功效，旨在为开发功能性微生态制剂及其在养殖中的应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 菌株及培养基

菌株来自制泡菜、酸奶（蚌埠市双华乳品有限公司）、土壤(取自安徽科技学院西校区）、新鲜牛奶。

MRS 固体培养基制备[7]：蛋白胨 10 g、牛肉膏 10 g、酵母提取物 5 g、葡萄糖 20 g、三水合醋酸钠 5 g、柠檬酸二胺 2 g、吐温 80.1 g、磷酸氢二钾 2 g、七水硫酸镁 0.58 g、四水硫酸锰 0.25 g、碳酸钙 7.5 g、琼脂 22.5 g，用去离子水定容至 1 000 mL，pH 6.5，121 ℃灭菌 40 min。

MRS 液体培养基：除不含碳酸钙、琼脂外，其他成分与 MRS 固体培养基相同，再用蒸馏水定容至 1 000 mL，pH 6.5。

分离培养基：牛肉膏 10 g、酵母膏 10 g、蛋白胨 10 g、葡萄糖 5 g、吐温 80.5 g、番茄汁 200 g、溴甲酚绿 0.1 g、碳酸钙 20 g、琼脂 20 g，蒸馏水定容至 1 000 mL，pH 6.5。

1.2 目的菌株的分离、纯培养与活化传代

取泡菜、酸奶、土壤、新鲜牛奶样品各 1 g，分别接种于装有 MRS 液体培养基的 150 mL 三角烧瓶中，

35 ℃静止培养 48 h；无菌操作将培养液接种于分离培养基中，35 ℃条件下静止培养 48 h；无菌操作挑取分离培养基中周围呈现黄色的疑似单个菌落，接种于 MRS 液体培养基中，37 ℃静止培养。

取 1 mL MRS 液体培养液与无菌生理盐水 10 倍梯度稀释成 10^{-6}、10^{-7}、10^{-8} 3 个浓度梯度，取 100 μL 均匀涂布 MRS 固体培养基平板，37 ℃培养 48 h。无菌操作挑取出现圆形乳白色并有溶钙圈的单个菌落，进行分离纯化。

将所筛菌株接种于 MRS 斜面培养基上，35 ℃培养 48 h，4 ℃保存，菌株每 20 d 传代 1 次。将保藏菌株接种于 MRS 固体培养基中，35 ℃培养 48 h，再转接至 MRS 液体培养基中培养 22 h 用作发酵种子菌株。

1.3 目的菌株的革兰氏染色鉴定

对目的菌株进行革兰氏染色，观察菌株的形态特征。

1.4 目的菌株的分子生物学鉴定

取 10 mL 菌株培养液，低速离心获得菌体。用细菌基因组 DNA 提取试剂盒（DP302，上海生工生物工程有限公司）提取细菌总 DNA。以 10 ng 纯化的细菌总 DNA 作为模板，扩增 16S rDNA 基因。所用引物为原核生物 16S rDNA 基因的通用引物：上游引物为 5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′，下游引物为 5′-CTACGGCTACCTTGTTACGA-3′，引物由上海生工生物工程有限公司合成。PCR 扩增体系为 50 μL，包括：1.0 μL DNA 模板，10×Buffer，2.0 μL dNTP，1.0 μL 上游引物(10 pmol)，1.0 μL 下游引物(10 pmol)，1.0 μL Taq DNA 聚合酶，1.4 μL Mg^{2+}，补重蒸水（ddH_2O）至 50 μL。扩增条件：94 ℃，5 min；94 ℃，1 min；56 ℃，1 min；72 ℃，2 min，30 个循环；72 ℃延伸 5 min，4 ℃终止反应。PCR 产物全序列由上海生工生物工程有限公司测定。

1.5 序列分析及系统发育树的构建

根据 16S rDNA 基因测序结果，使用核算序列对比检索（nucleotide basic local alignment search tool，N-BLAST）比对初步确定菌种。结合 GenBank 中乳酸菌属（*Lactobacillus*）中其他菌种的 16S rDNA 基因序列，利用 MEGA 3.0 软件绘制系统发育树。

1.6 目的菌株所产 GABA 的定性测定

将上述所得种子液以 3.5%接种量无菌操作接种于发酵培养基中，37 ℃恒温培养 48 h，取发酵液 5 mL，

4 500 r/min 离心 5 min，取上清采用改良纸层析法检测发酵液中是否含有 GABA。改良纸层析的测定方法是：按 0.55%的比例将显色剂茚三酮加入展开剂中，展开剂组成为正丁醇：冰醋酸：水=5：3：1（体积比），取待测液 10 μL 进行点样，GABA 配成浓度 5 g/L 做参比，展开后 85 ℃显色 8 min。若纸层析反应体系中存在与 GABA 标准品相对迁移率一致的茚三酮显色斑点，说明样品中含有 GABA，则该菌即为筛选到的产 GABA 的菌株，将筛选得到的产 GABA 目的菌株进行保藏。

1.7　目的菌株所产 γ-氨基丁酸的定量测定

高效液相色谱（HPLC）法定量测定菌液中 GABA 含量的原理：在菌液中加 β-巯基乙醇，使 GABA 与邻苯二甲醛迅速反应，生成邻苯二甲醛(OPA)衍生物；在紫外区 338 nm 处，根据 OPA 衍生物的吸收峰，通过测定其吸光度值精确测定样品中的 GABA 含量。

GABA 标准溶液的配制：用电子天平准确称量 GABA 标准品，配制浓度分别为 0、0.05、0.10、0.15、0.20、0.25 mg/mL 的标准 GABA 溶液。

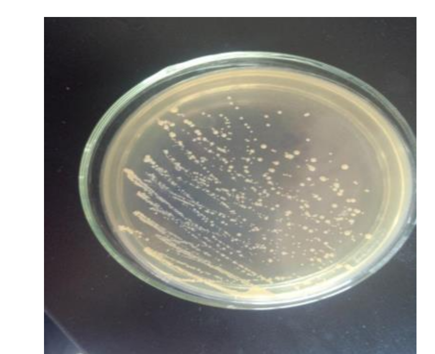
HPLC 检测条件如下：仪器型号为 Waters-1525；色谱柱为 Hypersil ODS-2 C18（150 mm×4.0 mm，5 μm 及相应的保护柱）；检测器为紫外检测器；进样量为 20 μL；流动相 A 为 20 mmol/L 醋酸钠缓冲液（醋酸钠 2.72 g，三乙胺 200 μL，加超纯水至 1 L，调节 pH 为 7.3），0.22 μm 滤膜过滤，脱气；流动相 B 为乙腈，A：B=4：1；流速为 1 mL/min；柱温为 40 ℃；衍生试剂为 OPA 20 mg，加 β-巯基乙醇 20 μL、乙腈 5 mL 混匀即可。衍生反应：取硼酸缓冲液 100 μL（硼酸 24.7 g，加超纯水 1L，调节 pH 至 10.4），OPA 衍生剂 20 μL，样品 20 μL，混合均匀后室温反应 5 min 后开始测定。

2　结果与分析

2.1　目的菌株的菌落特征

从泡菜、酸奶、土壤、新鲜牛奶中分离得到多个菌株，选取其中的 1 个菌株 F6 进行形态学观察鉴定。F6 菌落光滑、圆形、直径 1~2 mm、边缘整齐、乳白色，表面细腻（图 1）。在分离培养基上培养生长的 F6 菌落使其周边的培养基变成黄色，菌落周围形成透明圈（图 1-A），这是由于乳酸菌生长过程中产生乳酸，能使含有溴甲酚绿的分离培养基变成黄色，推测 F6 是一株乳酸菌。在 MRS 固体培养基上培养生长的 F6 菌

落不透明，周围有透明圈（图 1-B）。





A：分离培养基 Isolation medium　　B：MRS 固体培养基 MRS solid medium

图 1　菌株 F6 的菌落形态

Fig.1　Colony morphology of the bacterial strain F6

2.2　目的菌株所产 GABA 的定性测定

改良纸层析法分析结果显示，目的株菌 F6 具有与 GABA 标准品相同 R_f 值（即指比移值，斑点中心距原点的距离与溶剂展开前沿距原点距离的比值）的斑点，层析斑点较深，表明 GABA 产量较高，图 2 为目的株菌的改良纸层析图。

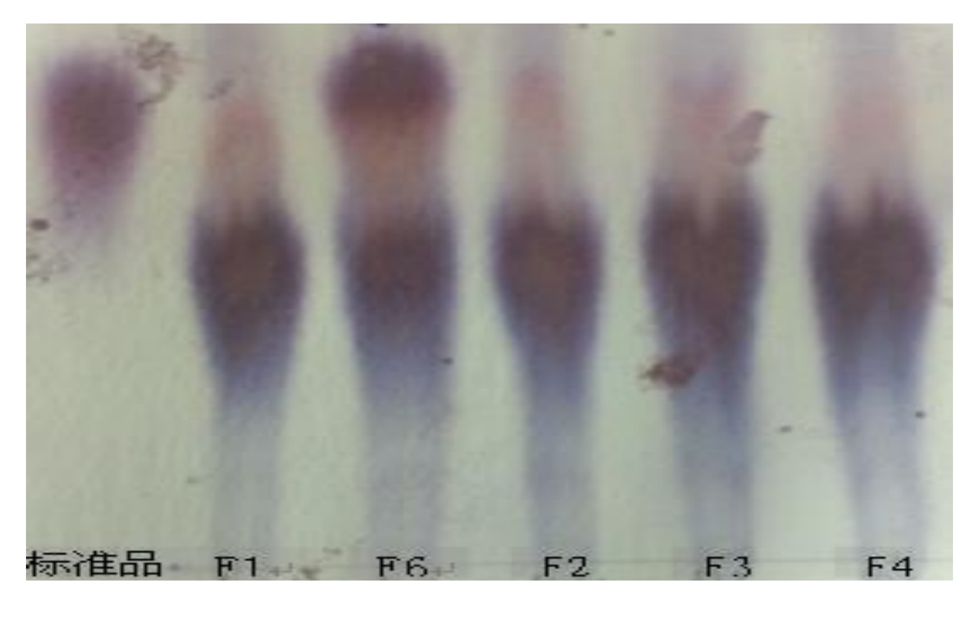


图 2　菌株 F6 的发酵液改良纸层析图谱

Fig.2　The improved paper chromatography map of the bacterial strain F6’s fermentation broth

2.3　目的菌株的形态特征

菌株 F6 的染色结果如图 3 所示，菌体形态呈圆或椭圆形，直径 0.5~1.0 μm，大多数呈双或短链状排列，通常不运动，革兰氏染色呈阳性。

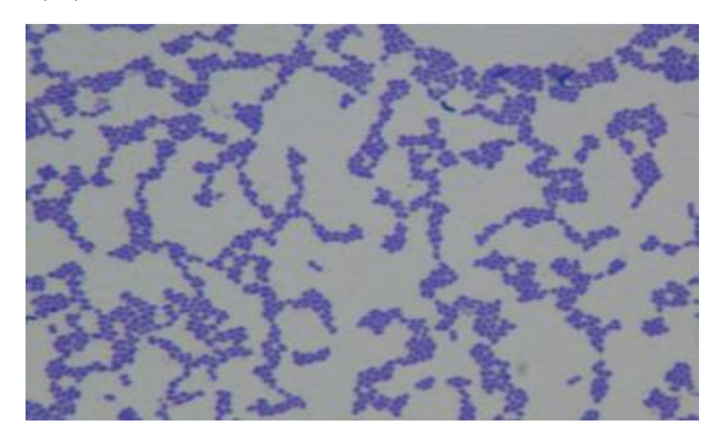


图 3　菌株 F6 的显微结构图

Fig.3　Microscopic structure of bacterial strain F6 (1 600×)

2.4　16S rDNA 基因序列分析与系统发育树构建

菌株 F6 的 16S rDNA 基因测序后，提交到 DNA 序列数据库 GenBank。将测得的菌株 F6 的 16S rDNA 序列在美国国家生物技术信息中心(National Center of Biotechnology Information，NCBI)主页上进行 N-BLAST 分析比对，结果如图 4 所示。菌株 F6 的 16S rDNA 基因序列与 GenBank 数据库中粪肠球菌（*Enterococcus faecium*）的相似性大于 99%，表明两者均为粪肠球菌的不同菌株。

```
         10        20        30        40        50
AGAGTTTGATCCTGGCTCAGCCCGGGCGGGTGCTATACATGCAGTCGTAC      50
GCTTCTTTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAGGAGTGGCGAA     100
CGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGGATAACACTTG     150
GAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTT     200
GAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCT     250
AGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAG     300
AGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGA     350
GGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACG     400
CCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAA     450
GAACAAGGATGAGAGTAACTGTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAA     500
GCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGC     550
GTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTC     600
TGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAG     650
ACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGC     700
GTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAA     750
CTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTG     800
GTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCC     850
TTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCG     900
CAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGC     950
ATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATC    1000
CTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTCCCCTTCGGGGGCAAAGTGACAGG    1050
TGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC    1100
GCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTCAGTTGGGCACTC    1150
TAGCAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAAT    1200
CATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTAC    1250
AACGAGTTGCGAAGTCGCGAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCTTCTCTCA    1300
GTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTA    1350
ATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACAC    1400
CGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACC    1450
TTTTTGGAGCCAGCCGCCTAAGGTGCATAGGAATGGGAAGTCGTAACAAG    1500
GTAGCCGT                                              1508
```

图 4　菌株 F6 的 16SrDNA 基因序列

Fig.4　16S rDNA gene sequence of bacterial strain F6

菌株 F6 的 16S rDNA 基因序列与 NCBI 主页 GenBank 数据库中部分细菌的 16S rDNA 基因序列进行同源性比对，为显示菌株 F6 与相似菌种之间的亲缘关系及其系统地位，用 MEGA 3.0 软件构建系统发育树（图 5）。结果显示，菌株 F6 与粪肠球菌的亲缘关系最近，其次是屎肠球菌（*Enterococcus durans*）。由此确定菌株 F6 为粪肠球菌。

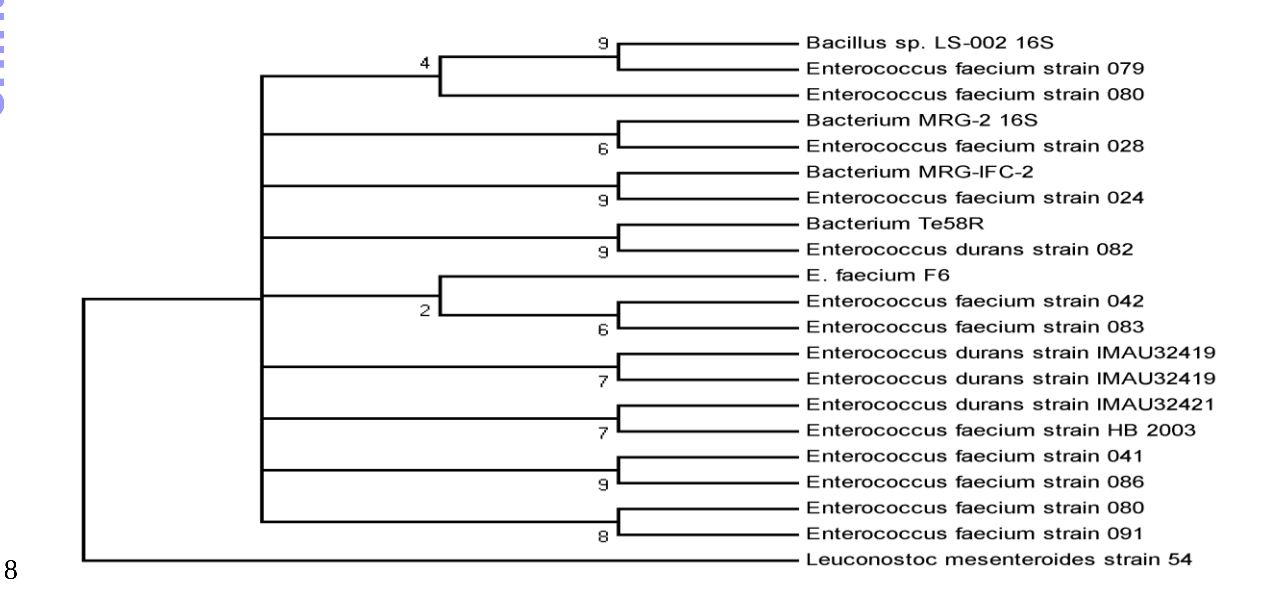


图 5　以菌株 F6 的 16S rDNA 基因序列为基础的系统发育树

Fig 5　Phylogenetic tree based on 16S rDNA gene sequences of bacterial strain F6

2.5 目的菌株所产 GABA 的定量测定

2.5.1 标准曲线绘制

采用 HPLC 法精确测定标准液中 GABA 含量[8-9]，GABA 标准液中的 GABA 峰形如图 6 所示。以峰面积对 GABA 含量作图，准确绘制出标准曲线（图 7）。结果显示，峰面积和 GABA 含量呈强相关的线性关系，线性方程为：Y=7 080 733.139 5X-4 511.692 7（R^2=0.999 4）。

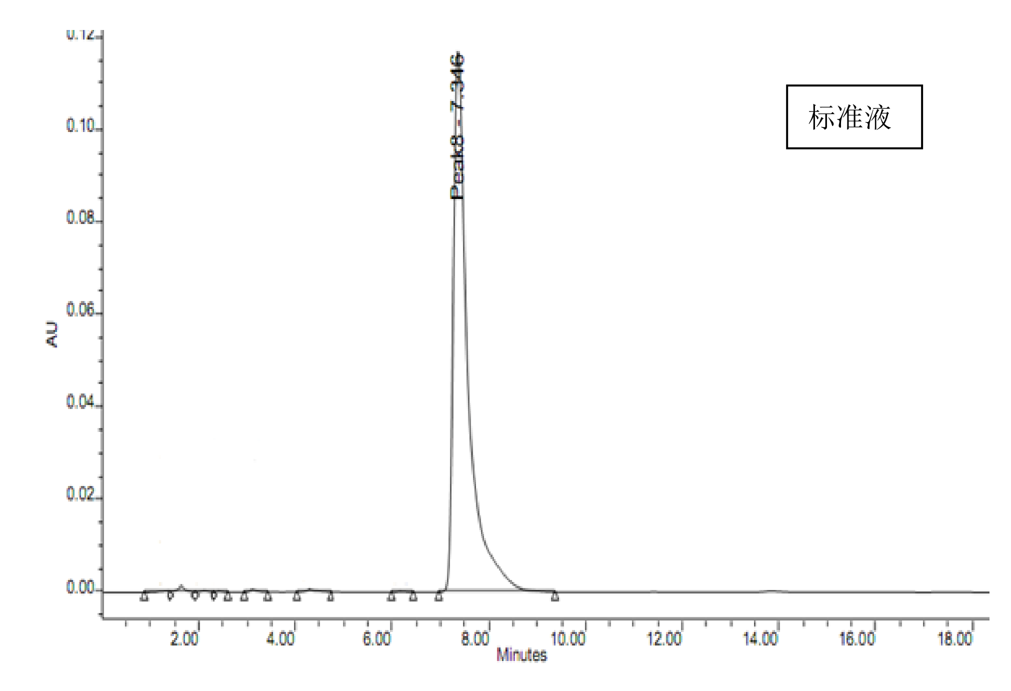


图 6　标准液中 GABA 的 HPLC 检测图

Fig 6　GABA detection map in the standard solution by HPLC

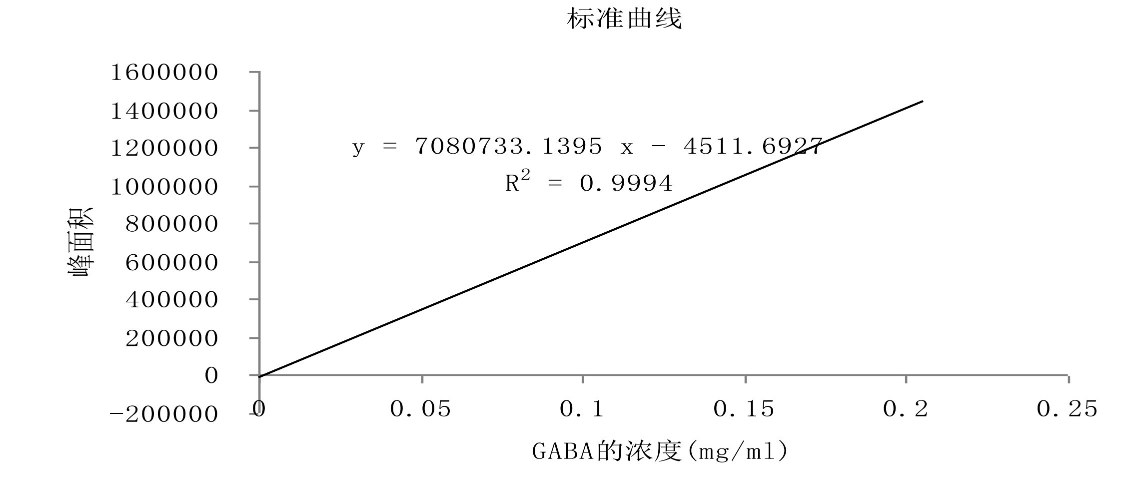


图 7　HPLC 法建立的 GABA 的标准曲线

Fig.7　Standard cure of GABA standed by HPLC method

2.5.2 目的菌株所产 GABA 的定量

采用 HPLC 法精确测定菌株 F6 发酵液的色谱图峰面积，如图 8 所示。根据上述得到的标准曲线线性方程 Y=7 080 733.139 5X-4 511.692 7，计算出菌株 F6 发酵液中 GABA 含量为 7.1 g/L，保留时间为 7~10 min，峰面积为 50 268 693.6，吸光度值为 0.12。

图 8　菌株 F6 发酵液中 GABA 的 HPLC 检测图

Fig 8　GABA detection map in the bacterial strain F6 fermented solution by HPLC

3　讨　论

3.1　产 GABA 粪肠球菌的筛选

从酸奶、土壤、牛奶、泡菜中均分离得到产 GABA 的菌株，其中自酸奶样品中筛选得到的一菌株产 GABA 量相对较高，命名 F6，表明从自然界中筛选高产 GABA 目的菌株是可行的。本试验在对目的菌株传统表型特征、生物学特性等进行快速筛选的基础上，采用改良纸层析法对目的菌株代谢产物 GABA 进行定性检测，准确、快速确定了菌株产 GABA 的能力。改良后纸层析法为按 0.55%的比例将显色剂茚三酮加入展开剂中，展开剂组成为正丁醇：冰醋酸：水=5：3：1（体积比），展开后 85 ℃显色 8 min，相比一般纸层析法显色时间 15~20 min 有明显优势[10]，对快速筛选高产 GABA 目的菌株有一定参考价值。本试验通过分子生物学方法，

将菌株 F6 的 16S rDNA 基因序列与 GenBank 数据库中部分细菌的 16S rDNA 基因序列进行同源性比对，其与粪肠球菌的相似性大于 99%，确定目的菌株 F6 为粪肠球菌，这为通过基因工程菌大量制备 GABA 提供了目的菌株。

3.2　GABA 的制备方法

GABA 的制备方法有化学合成法和生物合成法 2 种[10]。化学合成法成本较高，得率较低，并且在生产工艺中使用危险溶剂，甚至是有毒溶剂，因此化学合成法制备的 GABA 不能用于食品和饲料，也不能认为是一种天然的食品或饲料添加剂[11-12]。生物合成 GABA 是应用纯的微生物技术，通过筛选优良高产的安全菌种，发酵生产得到，是天然食品与饲料添加剂，公认使用的安全菌为乳酸菌，如短小乳杆菌[10]，而筛选的产 GABA 粪肠球菌颇少。生物合成法获得的 GABA 虽然纯度不高，但动物的吸收率比高纯度化学合成法的 GABA 有较大提高，并且产 GABA 乳酸菌可不经提纯,直接添加到动物饲粮中。本试验以粪肠球菌为目标菌株，较乳酸杆菌的抗逆性更强，因此可发挥乳酸菌的微生态平衡调控和 GABA 抗应激的双重作用，功效叠加。

3.3　乳酸菌的 GABA 产量

自然界中直接筛选的乳酸菌合成 GABA 产量一般都不高，为 5~7 g/L[13-14]，所用菌株多为乳酸杆菌类。冯志彬等[15]研究短小乳杆菌 A8 菌株后发现，初始 pH 4.5、温度 33 ℃、接种量 20%、发酵时间 3 d 为该菌株的最佳发酵条件，GABA 产量最高可达 19.2 g/L，并发现培养基的 pH 是影响 GABA 产量的主要因素。本试验目的菌株为粪肠球菌，发酵液中 GABA 含量为 7.1 g/L；最佳发酵条件为发酵温度 36 ℃、原始 pH 6.4、接种量 4.5%、种龄 20~23 h、发酵时间 60 h，在最佳培养、发酵条件下，粪肠球菌 F6 发酵液中 GABA 的含量可提高到 9.5 g/L，这可能与不同培养条件影响目的菌株谷氨酸脱羧酶（glutamate decarboxylase，GAD）的活性有关。

利用传统诱变技术筛选能够提高乳酸菌的 GABA 产量。夏江等[16]先后使用紫外线和 γ-射线对产 GABA 的短乳杆菌进行诱变处理，使 GABA 平均产量提高 142.9%，经诱变处理的短乳杆菌虽然 GABA 产量提高，但乳酸菌的固有功能作用降低，并且因不确定性、盲目性和遗传不稳定性，利用诱变乳酸菌所产 GABA 尚有潜在安全风险。

近几年，有文献报道利用重组大肠杆菌表达提取 GAD，以固定化酶的方式生产 GABA，但是转化效率普

遍不高[17]。已清楚 GABA 的生物合成途径是谷氨酸脱羧酶将 *L*-谷氨酸转化为 GABA。本后续试验拟通过增加现有菌株 F6 中 *GAD* 基因表达盒的数量，提高菌株细胞内 *GAD* 的表达，进而提高 GABA 的合成量[18-20]，这尚在研究中。

3.4　粪肠球菌所产 GABA 的定量测定

本试验首先对发酵液中 GABA 进行定性测定，即采用改良纸层析法检测发酵液中是否含有 GABA。按 0.55%的比例将显色剂茚三酮加入到展开剂中，展开后 85 ℃显色 8 min，通过观察斑点快速定性确定 GABA 的存在。

本试验采用 HPLC 法测定发酵液中 GABA 的含量，GABA 在 β-巯基乙醇存在条件下能与邻苯二甲醛迅速反应，生成 OPA 衍生物，而 OPA 不会干扰检测，色谱图基线较稳定，标准曲线的 R^2 为 0.999 4，因此本试验采用的 HPLC 法简单、快速、灵敏，得到的结果可靠。

4　结　论

本试验筛选得到的菌株F6为粪肠球菌，是一株功能性乳酸菌，具有高产GABA的能力。

参考文献：

[1]　张传贵.增塑剂污染及其对人体的影响[J].生物学通报,1999,34(2):20.

[2]　堀江典子,菅美奈子,金武祚.GABA(γ-氨基丁酸)的功能性[J].中国食品添加剂,2010(6):169–173.

[3]　梁恒宇,邓立康,林海龙,等.新资源食品—γ-氨基丁酸(GABA)的研究进展[J].食品研究与开发,2013,34(15):119–123.

[4]　MORTEZA Z,VAHHAB B,HOSSEIN J.Effects of central histamine receptors blockade on $GABA_A$ Agonist-induced food intake in broiler cockerels[J].Pakistan Journal of Biological Sciences,2008,11(3):416–421.

[5]　白松,林向阳,阮榕生,等.γ-氨基丁酸的分布和制备[J].现代食品科技,2005,21(2):202–205.

[6]　耿敬章.γ-氨基丁酸(GABA)在食品工业中的应用研究[J].饮料工业,2012,15(1):11–14.

[7]　李丽微,谷新晰,卢海强,等.发酵山药酸奶益生乳酸菌菌株的筛选[J].中国食品学报,2015(11):78–82.

[8]　BUCK K,VOEHRINGER P,FERGER B.Rapid analysis of GABA and glutamate in microdialysis samples using high performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry[J].Journal of Neuroscience

Methods,2009,182(1):78–84.

[9] JÁMBOR A,MOLNÁR-PERL I.Amino acid analysis by high-performance liquid chromatography after derivatization with 9-fluorenylmethyloxycarbonyl chloride:literature overview and further study[J].Journal of Chromatography A,2009,1216(15):3064–3077.

[10] 汪祥燕,徐海燕,辛国芹,等.γ-氨基丁酸产生菌的分离及发酵条件优化[J].中国饲料,2016(4):27–31.

[11] 杨晶晶,曲媛,崔秀明.γ-氨基丁酸的制备方法与含量测定研究进展[J].食品工业科技,2014,35(3):351–356.

[12] CHOI S I,LEE J W,PARK S M.et a1.Improvement of γ-aminobutyric acid (GABA) production using cell entrapment of *Lactobacillus brevis* GABA 057[J].Journal of Microbiology and Biotechnology,2006,16(4):562−568.

[13] 缪存影,蒋冬花,徐晓波,等.酸菜中高产 γ-氨基丁酸乳酸菌的筛选和鉴定[J].微生物学杂志,2010,30(2):28–32.

[14] 王超凯,刘绪,张磊,等.产 γ-氨基丁酸乳酸菌的筛选及发酵条件初步优化[J].食品与发酵科技,2012,48(1):36–39.

[15] 冯志彬,吴思颖,张玉香,等.短乳杆菌产 γ-氨基丁酸发酵条件的优化[J].鲁东大学学报:自然科学版,2012,28(3):248–251.

[16] 夏江,梅乐和,黄俊,等.产 γ-氨基丁酸的乳酸菌株筛选及诱变[J].核农学报,2006,20(5):379–382.

[17] 田灵芝,徐美娟,饶志明.一株重组大肠杆菌/pET-28a-lpgad 的构建及其高效生产 γ-氨基丁酸转化条件的优化[J].生物工程学报,2012,28(1):65-75.

[18] KOOK M C,SEO M J,CHEIGH C I,et al.Enhancement of γ-amminobutyric acid production by *Lactobacillus sakei* B_2-16 expressing glutamate decarboxylase from *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917[J].Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry,2010,53(6):816−820.

[19] KOMATSUZAKI N,SHIMA J,KAWAMOTO S,et al.Production of γ-aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus paracasei* isolated from traditional fermented foods[J].Food Microbiology,2005,22(6):497−504.

[20] LIU T T,YANG T W,ZhANG S C,et al.Screening,identification and primary optimizing of a strain producing γ-aminobutyric acid from *L*-glutamic acid[J].Journal of Food Science and Biotechnology,2010,29(5):742−747.

Screening of *Enterococcus faecium* Producing γ-Amminobutyric Acid and Quantitative Detection of γ-Amminobutyric Acid

ZHU Quan[1]　CHENG Jinlong[2]　ZHU Yuanzhao[3*]　YIN Long[2]　NI Jindong[1]　CHENG Maoji[1i]

(1. *College of Animal Science*, *Anhui Agricultural University*, *Hefei* 230061, *China*; 2. *Jiangsu Unison Biotechnology Development Co*., *Ltd*., *Suqian* 223831, *China*; 3. *College of Animal Science*, *Anhui Science and Technology University*, *Fengyang* 233100, *China*.）

Abstract: This study was aimed to isolate and identify an *Enterococcus faecium* by molecular biological methods which produce γ-aminobutyric acid (GABA), moreover, the amount of GABA was also quantitatively determined. One target strain of *Enterococcus faecium* F6 was screened out from the samples of pickles, yogurt, soil and fresh milk, and was identified according the morphological characters and Gram stain methods. After the 16S rDNA gene of bacterial strain F6 was amplified, the gene sequence and phylogenetic tree were analyzed. Meanwhile, the GABA content in the fermented solution of bacterial strain F6 was quantitatively determined by high performance liquid chromatography (HPLC) method. The results showed that the bacterial strain F6 took a large, smooth, round and a neat edge of shape with a diameter of 1 to 2 mm and in a milky white color. A transparent circle was formed around the colony on the separating medium which changed to be yellow. On the MRS solid medium, the colony was opaque with a transparent circle around. Gram stain was used to identify F6 as a positive strain. The 16S rDNA gene sequence of bacterial strain F6 was more than 99% similarity to that of *Enterococcus faecium* in GenBank showed by molecular biological analysis. HPLC method was used to draw out the GABA standard curve linear equation as follows: Y=7 080 733.139 5X-4 511.692 7 (R^2=0.999 4), and the content of 7.1 g/L of GABA with 7 to 10 minutes of retention time was determined in the fermented solution of F6 according to linear equation. The results indicate that a high yield GABA of *Enterococcus faecium* F6 is finally obtained.

Key words: *Enterococcus faecium*; γ-aminobutyric acid; 16S rDNA sequence analysis; quantitative detection by high performance liquid chromatography method; screening

∗Corresponding author, professor, E-mail: zhuyuanzhao111@163.com.cn　(责任编辑　菅景颖)